

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intellectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
13 de Septiembre de 2001 (13.09.2001)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 01/66794 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C12Q 1/68,
C12P 19/34

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES01/00079

(22) Fecha de presentación internacional:
2 de Marzo de 2001 (02.03.2001)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P 200000560 8 de Marzo de 2000 (08.03.2000) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo
US): CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGA-
CIONES CIENTÍFICAS [ES/ES]; Calle Serrano, 117,
E-28006 Madrid (ES). UNIVERSIDAD DE LAS ISLAS
BALEARES [ES/ES]; Ctra. Valldemossa, Km. 7, 5,
ED. Son Lledo, E-07071 Palma de Mallorca (ES). UNI-
VERSIDAD DE VALENCIA [ES/ES]; Carrer L'antiga
Senda Sement, 11, E-46023 Valencia (ES). CAROB, S.A.
[ES/ES]; Celleters, 143, E-07141 Marratxi (Palma de
Mallorca) (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): BENEDI
BENITO, Vicente, Javier [ES/ES]; Universidad de las
Islas Baleares, Ctra. Valldemossa, KM 7, 5, Ed. Son
lledo, E-07071 Palma de Mallorca (ES). DOMÈNECH
SÁNCHEZ, Antonio [ES/ES]; Insto. Mediterraneo
Estudios Avanzados, Consejo Superior de Investigaciones
Científicas, Miguel Marques, 21, E-07190 Esporles (Palma
de Mallorca) (ES). HERNÁNDEZ VIADEL, María,
Luz [ES/ES]; Universidad de Valencia, Carrer L'antigua

Senda Sement, 11, E-46023 Valencia (ES). ALBERTÍ
SERRANO, Sebastián [ES/ES]; Universidad de las Islas
Baleares, Ctra. Valldemossa, KM. 7, 5, Ed. Son Lledo,
E-07071 Palma de Mallorca (ES). ROSSELLÓ PICOR-
NELL, Josep, Antoni [ES/ES]; Universidad de Valencia,
Carrer L'antigua Senda Sement, 11, E-46023 Valencia
(ES).

(74) Mandatario: OJEDA GARCÍA, Pedro; Consejo Su-
perior de Investigaciones Científicas, Calle Serrano, 113,
E-28006 Madrid (ES).

(81) Estados designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Estados designados (regional): patente ARIPO (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), patente
euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), patente OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivin-
dicaciones y para ser republicada si se reciben modifica-
ciones

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: MOLECULAR METHODS FOR DETECTING GUAR GUM ADDITIONS TO LOCUST BEAN GUM

(54) Título: MÉTODOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE ADICIONES DE GOMA DE GUAR AL GARROFÍN

(57) Abstract: The invention concerns methods for detecting guar gum alone or in mixtures of guar gum and locust bean gum. The invention also concerns methods for extracting, amplifying and detecting DNA of guar and locust bean gums and the mixtures thereof. DNAs of plants from which guar and locust bean gums are extracted are amplified by means of polymerase chain reaction (PCR) using conserved initiators. Differences in the sequences of the amplification products obtained from these two plants enable their differentiation, the identification of guar DNA in mixtures of guar and locust bean mixtures and the design of guar-specific PCR initiators which detect guar only in mixtures of guar and locust bean gums.

(57) Resumen: Esta invención describe los métodos para detectar la goma de guar, sola o en mezclas de goma de guar con goma de garrofin. Describe los métodos para la extracción, amplificación, y detección del DNA de las gomas de guar y garrofin y de sus mezclas. El DNA de las plantas de las que se extraen las gomas de guar y garrofin se amplifican mediante la cadena en reacción de la polimerasa (PCR) usando unos iniciadores conservados. Las diferencias en las secuencias de los productos de amplificación obtenidos a partir de esas dos plantas permiten su diferenciación, la identificación de DNA de guar en mezclas de gomas de guar y garrofin, y el diseño de iniciadores de la PCR específicos del guar que lo detectan sólo en mezclas de gomas de guar y garrofin.

WO 01/66794 A1

a / PRTS

JC07 PCT/PTO 0.8 NOV 2001
10/009980
PCT/ES01/00079

WO 01/66794

1

Título

MÉTODOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE ADICIONES DE GOMA DE GUAR AL GARROFÍN

5 Sector de la técnica

El garrofin o goma de algarroba, extraído de las semillas del algarrobo (*Ceratonia siliqua*), y la goma de guar, extraída de las semillas de la planta de guar (*Cyamopsis tetragonolobus*) se usan como aditivos alimentarios. Se utilizan fundamentalmente como espesantes, gelificantes, o estabilizantes en la industria alimentaria. Tal como se describe en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas de 9 de Diciembre de 1998, páginas L334/11 a L334/13, el garrofin tiene el número de código E 410 y la goma de guar tiene el E 412, y en esta patente usaremos esos códigos como sinónimos de las correspondientes gomas. Como aditivos alimentarios E 410 y E 412 se utilizan individualmente o juntos, o incluso en combinación con otros aditivos como los carragenatos (E 407), xantana (E 415), y pectina (E 440i). La adición de esos agentes confiere a los alimentos una serie de efectos como el espesamiento, suavidad, textura, etc. Algunos ejemplos de estas adiciones y de los efectos que provocan son: el aumento del tiempo de fusión en helados, la reducción en la pérdida de sólidos y aceleración en el cuajado durante la fabricación de quesos untables, y favorecer la unión entre las diferentes carnes que forman parte de salchichas, el salami y otros embutidos. Además, dependiendo del tipo de alimento y del aditivo, se añaden E 410 ó E 412, o ambos, dentro de límites máximos permitidos de entre el 0,15 y el 2 %, a alimentos como mermeladas, productos lácteos, cereales de desayuno, sopas deshidratadas, salsas, jarabes, etc.

25 Estado de la técnica

Tal como se describe en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas [European, C. 1998. Commission Directive 98/86/EC of 11 November 1998. Official Journal of the European Communities. 9.12.98:L334/11], E 410 y E 412 pueden diferenciarse mediante examen microscópico de sus soluciones acuosas teñidas con yodo y yoduro potásico. En esas preparaciones, el garrofin presenta células tubiformes alargadas, separadas o ligeramente interespaciadas. Sus contenidos de color marrón son más irregulares que los de la goma de guar. El E 412 muestra grupos de células redondeadas o piriformes cuyos

contenidos van del amarillo al marrón. Por lo tanto, teóricamente, estos métodos microscópicos deberían permitir la identificación de guar cuando estuviera formando partes de mezclas con el garrofin.

- La goma de guar y el garrofin, individualmente o mezclados, se pueden utilizar como
- 5 aditivos alimentarios, debiendo indicarse en la etiqueta de los alimentos la presencia de uno u otro aditivo, o la de ambos. Ambos aditivos son polisacáridos galactomananos, habiéndose descrito en la literatura diferencias en su composición química: relaciones galactosa:manosa de 1:4 y 1:2 para el garrofin y la goma de guar, respectivamente. Por lo tanto, E 410 y E 412 hidrolizados y derivatizados pueden diferenciarse fácilmente cuando
- 10 están aislados mediante cromatografía de gases y cálculo de la relación galactosa:manosa en el cromatograma resultante. Sin embargo, dependiendo de su origen, suministrador, y lote, se han descrito variaciones en el grado de sustitución por galactosa de la cadena central de manosa de esos dos polisacáridos. Así por ejemplo, 37 % en E 412 y 23 % en E 410 [Cheetham, N. W. H., B. V. McCleary, G. Teng, F. Lum, and Maryanto. 1986.
- 15 Gel-permeation studies on xanthan-galactomannan interactions. Carbohydr. Polym. 6:257-268.], relaciones galactosa:manosa para E 410 y E 412 de 1:2,69 y 1:1,44 [Angelini, E., C. Boniglia, M. Mosca, and G. Bellomonte. 1984. Detection and determination of plant gums by gas-chromatographic determination of their constituent monosaccharides. Rivista della Societa Italiana di Scienza dell'Alimentazione. 13:479-
- 20 484.], o de 3,01:1 y 1,48:1 [Preuss, A., and H. P. Thier. 1982. Quantitative analysis of natural thickeners and gums by methanolysis and capillary column gas chromatography. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 175:93-100.], respectivamente. Incluso se han descrito variaciones en los cocientes galactosa:manosa de entre 3,1:1 y 7,7:1 para fracciones del garrofin solubilizadas a temperaturas de entre 20 y 80 °C [Lopes da Silva, J. A., and M.
- 25 P. Gonçalves. 1990. Studies on a purification method for locust bean gum by precipitation with ethanol. Food Hydrocolloids. 4:277-287.]. Debido a esas variaciones de composición, en ciertas mezclas de gomas de guar y garrofin, puede ser técnicamente imposible asegurar los contenidos individuales de cada goma, y por las mismas razones puede ser técnicamente muy difícil el detectar adiciones de E 412 al E 410. De hecho se
- 30 han documentado casos de adulteración de E 410 con E 412. El interés de este tipo de fraudes radica en los diferentes precios de ambos aditivos, siendo el E 412 más barato que el E 410.

Los polisacáridos de origen vegetal se usan frecuentemente como agentes estabilizantes en la industria alimentaria, y por lo tanto se han desarrollado una serie de métodos químicos y algunos físicos para identificar y cuantificar esos aditivos en mezclas y en alimentos. Ninguno de esos métodos, según la revisión de Morley y colegas [Morley, R. G., G. O. Phillips, and D. M. Power. 1972. Fractionation and identification of commercial hydrocolloid stabilising agents. *Analyst*. 97:315-319] ni el esquema de fraccionamiento secuencial propuesto y descrito en esa referencia pueden distinguir entre E 410 y E 412. Más recientemente, se han descrito aplicaciones de tipo electroforético, cromatografía de gases, y cromatografía gas-líquido, que se han usado para identificar y cuantificar aditivos de tipo polisacárido, es decir del mismo tipo general que E 410 y E 412. Sin embargo, ninguno de esos métodos diferencian E 410 y E 412, además de que esos métodos sufren una serie de limitaciones, en particular cuando se aplican al análisis de alimentos, como son la necesidad de extracciones complejas de las muestras antes de su análisis y un equipamiento relativamente caro. Además, la hidrólisis de la muestra, un primer paso necesario para el análisis cromatográfico de una mezcla de E 410 y E 412 liberaría también, por ejemplo, manosa a partir de la xantana, incrementándose por lo tanto el contenido de manosa y afectando a la relación galactosa:manosa del cromatograma. La xantana es otro aditivo alimentario (E 415) que se usa frecuentemente en combinación con E 410 y/o E 412.

En otro método diferente descrito, E 410, E 412, y otros polisacáridos usados como agentes espesantes, se aislaron, pirolizaron, y los productos de la pirólisis se analizaron mediante cromatografía de gases. Aunque mediante monitorización del tiempo de retención y de ciertos iones seleccionados se identificaron espesantes individuales, no se consiguió determinar de manera precisa el contenido en agentes espesantes presentes en una mezcla compleja [Sjoeberg, A. M., and H. Pyysalo. 1985. Identification of food thickeners by monitoring of their pyrolytic products. *J. Chromatography*. 319:90-98.].

Se ha descrito un método usando la lectina extraída de *Bandeiraea simplicifolia* que permite la detección y cuantificación de goma de guar y garrofin en productos alimentarios comerciales [Patel, P. D., and G. B. Hawes. 1988. Estimation of food-grade galactomannans by enzyme-linked lectin assay. *Food Hydrocolloids*. 2:107-118.]. Aunque este método detectó en los alimentos E 410 y E 412 y no otros aditivos de tipo

polisacárido usados comúnmente (xantana, carragenatos, alginatos, pectina), el método no pudo diferenciar entre la goma de guar y el garrofin.

Finalmente, se han descrito métodos basados en el DNA para la detección/identificación de plantas y productos derivados de plantas. Por ejemplo, la patente WO/9814607 describe un método para detectar una especie vegetal particular en un producto alimentario. El método se basa en la detección de secuencias específicas de plantas localizadas en el DNA cloroplástico. En esa patente se describen regiones del DNA cloroplástico que contienen secuencias características de determinadas plantas usadas como ejemplo, y que permiten la diferenciación entre naranjas y mandarinas. Aunque los métodos descritos en esa patente pueden ser aplicables a la diferenciación de otras especies vegetales no descritas entre los ejemplos, los métodos no se aplicaron a la diferenciación del guar y el algarrobo ni de sus productos derivados E 412 y E 410, respectivamente. Por otra parte, se ha descrito que los estudios filogenéticos basados en el DNA cloroplástico no son a veces suficientemente resolutivos, es decir, que no permiten decidir sobre la asignación de una muestra a una determinada especie vegetal [Baldwin, B. G., M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Campbell, and M. J. Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Garden.* 82:247-277.]. Igualmente, los árboles filogenéticos basados en las secuencias de DNA cloroplástico y en otras líneas de evidencia (en otros caracteres) son a veces de difícil comparación porque producen resultados diferentes [Baldwin, B. G., M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Campbell, and M. J. Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Garden.* 82:247-277.]. Adicionalmente, no existen a día de hoy secuencias cloroplásticas en las bases de datos públicas para el guar, por lo que su diferenciación del algarrobo y otras plantas basándose en esas secuencias requeriría primero su identificación, aislamiento y secuenciación. Finalmente, por las razones que se detallarán a continuación, la extracción de DNA, cloroplástico o no, de agentes espesantes, puede requerir métodos particulares no descritos en la patente citada en este párrafo.

Finalmente, para esta patente es relevante la descripción de un método basado en el DNA para la detección de la contaminación por trigo de 35 muestras de alimentos y aditivos alimentarios [Allmann, M., U. Candrian, C. Höfelein, and J. Lüthy. 1993. Polymerase

chain reaction (PCR): a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food. Detection of wheat contamination in non-wheat food products. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 196:248-251.]. Este método está basado en la PCR y en el uso de iniciadores específicos del DNA ribosomal, es decir en secuencias del genoma del trigo que codifican para los componentes del RNA de los ribosomas de esa planta. Es de particular importancia para la presente patente el hacer notar que los autores del aludido método concluyen que los agentes o aditivos espesantes, y en concreto la goma de guar y el garrofin, no pueden ser utilizados como sustratos para la extracción del DNA ya que los efectos de espesamiento y de absorción que provocan hacen imposible la extracción del DNA.

Descripción

- Breve descripción de la invención

Describimos la existencia de secuencias de DNA diagnósticas que permiten la identificación de las plantas de las que se extraen las gomas de guar y garrofin. Esas secuencias se han detectado también en las gomas de guar y garrofin, por lo tanto su detección en el DNA extraído de esas gomas permiten asegurar que su origen era el algarrobo o el guar.

Mediante PCR y los iniciadores conservados descritos en la Figura 1A, hemos amplificado dos regiones denominadas ITS1 e ITS2 a partir del DNA extraído de las semillas de *Ceratonia siliqua* y *Cyamopsis tetragonolobus*, es decir las plantas de las que se extraen respectivamente el garrofin (E 410) y la goma de guar (E 412). El análisis de los productos de amplificación mediante enzimas de restricción mostró patrones de restricción específicos de cada planta. La secuenciación de esos productos de amplificación y la comparación de las secuencias alineadas mostró que ambas plantas pueden diferenciarse por la presencia de nucleótidos característicos de una u otra planta en determinadas posiciones de la secuencia. Además, el estudio en esas secuencias de nucleótidos compartidos por ambas plantas y otros específicos de cada una, mostró la presencia en la secuencia del DNA amplificado del guar de dos regiones que denominamos PG21 (SEQ ID NO 5) y PG22 (SEQ ID NO 6) cuyas secuencias pueden usarse como iniciadores para la amplificación específica mediante PCR de una región dentro de la región ITS2 del guar. Las secuencias y posiciones de esos iniciadores

específicos del guar pueden observarse en las Figuras 1A y 3. Cuando los iniciadores PG21 y PG22 se usaron para amplificar DNA extraído no de semillas de las plantas, sino de las gomas de guar (E 412) y garrofin (E 410) concluimos que los métodos de extracción de DNA habituales, cuando se aplican a esas gomas, no permiten la
5 amplificación de DNA mediante PCR. Por lo tanto, desarrollamos métodos alternativos de extracción de DNA a partir de esas gomas, que permitieron la amplificación del DNA. Usando los iniciadores PG21 y PG22, mediante PCR obtuvimos amplificación a partir del DNA extraído de todas las muestras conocidas de goma de guar y de ninguna muestra control de garrofin. Además, demostramos que con estos métodos de extracción y
10 amplificación de DNA hemos podido detectar DNA del guar tanto en mezclas control de guar y garrofin como en algunas preparaciones comerciales etiquetadas como "garrofin" y que por lo tanto en teoría no deberían contener guar.

- Descripción detallada de la invención y ejemplos

15 En esta patente usaremos el término garrofin ó E 410 para designar el producto de moler los endospermos de las semillas del algarrobo o *Ceratonia siliqua* [European, C. 1998. Commission Directive 98/86/EC of 11 November 1998. Official Journal of the European Communities. 9.12.98:L334/11.]. El término goma de guar ó E 412 se usará para designar el producto de moler los endospermos de las semillas de la planta de guar [European, C.
20 1998. Commission Directive 98/86/EC of 11 November 1998. Official Journal of the European Communities. 9.12.98:L334/11.]. Para una descripción más detallada de ambos términos, nos ajustamos a lo descrito en la referencia [European, C. 1998. Commission Directive 98/86/EC of 11 November 1998. Official Journal of the European Communities. 9.12.98:L334/11.]. Aunque la presente invención no reivindica aspectos
25 taxonómicos, algunas de las secuencias descritas en ella y que son parte de las reivindicaciones pueden tener aplicaciones taxonómicas. Por lo tanto, las posiciones taxonómicas de las especies del algarrobo y el guar merecen más explicaciones. Por ejemplo, en la referencia [European, C. 1998. Commission Directive 98/86/EC of 11 November 1998. Official Journal of the European Communities. 9.12.98:L334/11.]
30 ambas especies se consideran pertenecientes a la familia *Leguminosae*, mientras que otras fuentes como la base de datos de taxonomía del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/tax.html>) prefiere usar el nombre

de familia *Fabaceae*. Nosotros consideramos ambos nombres de familia como sinónimos, de acuerdo a lo considerado por el International Code of Botanical Nomenclature (Tokyo Code, Koeltz Scientific Books, Alemania, 1994). Otro aspecto taxonómico se refiere al nombre científico de la planta de guar, que es citada como *Cyamopsis tetragonolobus* en la referencia [European, C. 1998. Commission Directive 98/86/EC of 11 November 1998. Official Journal of the European Communities. 9.12.98:L334/11.] y como *Cyamopsis tetragonoloba* en la base de datos de taxonomía del NCBI. De nuevo, nosotros consideraremos aquí como sinónimos del guar los dos nombres de especie citados.

Los términos DNA, PCR, iniciadores, y secuencias, son inteligibles para los especialistas en biología molecular. Sin embargo, requieren alguna puntualización por su utilización en español y en inglés. DNA se refiere al ácido desoxirribonucleico. PCR se refiere a la cadena en reacción de la polimerasa o "polymerase chain reaction", una reacción enzimática del DNA en la que dos iniciadores complementarios a dos regiones del DNA (uno para cada una de las dos hebras o cadenas del DNA) que se quiere amplificar se añaden al DNA que se va a amplificar (DNA diana) en presencia de un exceso de nucleótidos a una polimerasa termoestable (polimerasa Taq). En una serie, generalmente 30, de ciclos de temperatura, el DNA diana se desnaturaliza, se une a los iniciadores, y se sintetiza una cadena hija a partir de cada iniciador. Las cadenas o hebras hijas, algunas veces denominadas amplicones, sirven como diana para sucesivos ciclos de amplificación en los que los fragmentos de DNA que contienen secuencias reconocidas por los iniciadores se amplifican exponencialmente. Los iniciadores, también denominados a veces cebadores o "primers", se refieren a una cadena corta preexistente de nucleótidos a la cual la Taq polimerasa puede añadir nuevos desoxirribonucleótidos durante el proceso de PCR. Los iniciadores PG21 (SEQ ID NO 5) y PG22 (SEQ ID NO 6) han sido producidos de manera sintética y son de suficiente longitud y tienen unas secuencias tales que se asegura que reconocen y se unen específicamente a zonas del DNA del guar dentro de las regiones denominadas ITS2 y no a las correspondientes al algarrobo. Por secuencias de DNA denominamos al orden relativo en el que las bases o nucleótidos (A, C, T, G) se disponen en un determinado fragmento de DNA, un gen, un cromosoma o un genoma.

Las regiones conocidas como "internal transcribed spacer" o ITS son parte del denominado DNA ribosómico (rDNA) 18S-26S que a su vez codifica para el RNA

- ribosomal (rRNA). Las ITS son regiones muy útiles para estudios filogenéticos de plantas [Baldwin, B. G., M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Campbell, and M. J. Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Ann. Missouri Bot. Garden. 82:247-277.]. La organización de estas regiones del genoma se muestra en la Figura 1A y consiste en: dos regiones ITS denominadas ITS1 e ITS2 separadas por una región conservada denominada 5.8S y flanqueadas por las regiones denominadas 18S y 26S. Mientras que las ITS son muy variables en secuencia entre familias y géneros diferentes de plantas, las regiones 5.8S, 18S, y 26S tienen secuencias muy conservadas. El pequeño tamaño de las ITS (menos de 300 nucleótidos) y el hecho de estar flanqueados por secuencias conservadas facilitan su amplificación mediante PCR con iniciadores que reconocen secuencias conservadas de las regiones flanqueantes. Las regiones ITS y otras regiones componentes del rDNA están en múltiples copias en el genoma de las plantas, por lo que su aislamiento, detección, amplificación y secuenciación, es relativamente fácil incluso a partir de muestras antiguas como los herbarios. Se han descrito variaciones en longitud (número de nucleótidos) de las ITS, y aunque esas variaciones son limitadas, en algunas ocasiones han permitido diferenciar entre especies próximas. Pero, lo que es más relevante para esta invención, las diferencias de secuencia entre las ITS generalmente permite diferenciar entre especies de plantas pertenecientes al mismo género.
- Esta invención describe los métodos para identificar la goma de guar, individual o en mezclas con el garrofin, mediante la amplificación de DNA y sus métodos de análisis. Para ello, usamos secuencias del rDNA, es decir secuencias de las regiones 18S, 5.8S, 26S, ITS1 e ITS2 descritas en la referencia [Baldwin, B. G., M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Campbell, and M. J. Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Ann. Missouri Bot. Garden. 82:247-277.] y en la Figura 1A. Puesto que esas secuencias eran hasta el momento desconocidas para el algarrobo y el guar, los primeros experimentos de esta invención se dirigieron a determinar las secuencias de las regiones denominadas ITS1 e ITS2 del genoma de esas especies vegetales.
- Con este fin, aislamos DNA de semillas del algarrobo y el guar, y lo amplificamos mediante PCR usando las parejas de iniciadores ITS5/ITS2 (SEQ ID NO 1/SEQ ID NO 4) e ITS3/ITS4 (SEQ ID NO 2/SEQ ID NO 3) descritos [White, T. J., T. Bruns, S. Lee,

and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed.), PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc., San Diego]. Esas parejas de iniciadores amplifican respectivamente las regiones ITS1 e ITS2 y parte de sus regiones adyacentes (ver Figura 1A). Los productos de amplificación se secuenciaron directamente o bien se detectaron por electroforesis en geles de agarosa, se aislaron y purificaron a partir de ellos, se clonaron y secuenciaron. Las secuencias obtenidas se alinearon mediante programas de ordenador y se identificaron las regiones ITS1 e ITS2 y sus regiones adyacentes. La identificación se realizó mediante comparación de las secuencias obtenidas con otras secuencias conocidas del rDNA de plantas. Los detalles experimentales y los correspondientes resultados se explican en el ejemplo I.

Los análisis de las secuencias obtenidas a partir de las semillas del guar y el algarrobo demostraron que tanto la región ITS1 como la ITS2 de ambas plantas difieren entre si en la composición y secuencia. El análisis de dichas secuencias mediante digestión con endonucleasas o enzimas de restricción (restringidas) puede realizarse mediante programas informáticos, como el programa MacVector (Oxford Molecular Group PLC), para así predecir los tamaños de los fragmentos que se generarían mediante el uso de cada restringida. Realizamos ese tipo de análisis informático (resultados no mostrados) y seleccionamos algunas restringidas para mostrar la utilidad de este tipo de análisis como método de diferenciación del DNA de ambas plantas. Con este fin, amplificamos separadamente las regiones ITS1 e ITS2 de ambas plantas a partir del DNA extraído de sus semillas, tal como se detalla en el ejemplo I. Los productos de amplificación se purificaron y digirieron con varias restringidas que generan patrones de restricción diferenciales para el guar y el algarrobo. Los resultados de este tipo de análisis, y los detalles experimentales correspondientes, se describen en el ejemplo II.

Las diferencias en las secuencias de DNA obtenidas a partir del DNA extraído de las semillas de guar y algarrobo sugirieron que podría diseñarse una metodología, basada en la PCR y en dichas secuencias, para la detección específica del guar. El estudio detallado de las secuencias obtenidas para ambas plantas (mostrado en las Figuras 2 y 3) mostró zonas donde las diferencias de secuencia entre ambas plantas eran mayores. Así, como ejemplo no limitante de esta estrategia, elegimos dos regiones que denominamos PG21 y

- PG22 en la Figura 3, para ser utilizados como iniciadores específicos del guar en experimentos de PCR. En esas dos regiones las secuencias de las dos plantas difieren en varios nucleótidos, particularmente en las regiones 3' de los iniciadores indicados. Es bien conocido en el campo de la PCR y de la biología molecular que las diferencias de secuencia en las zonas 3' de los iniciadores, más que en la zona 5', incrementan la especificidad de los iniciadores. Como se detalla en el ejemplo III, el DNA extraído de las semillas de guar amplificó con los iniciadores PG21/PG22, pero no se obtuvo amplificación a partir del DNA extraído del algarrobo. Estos resultados demostraron la especificidad de los iniciadores que habíamos diseñado.
- 10 Como hemos mencionado en otros apartados, la amplificación de DNA mediante PCR a partir de muestras vegetales y otras muestras ricas en polisacáridos no es siempre una tarea fácil, ya que los polisacáridos son buenos inhibidores de la mayoría de los enzimas utilizados en biología molecular, como las polimerasas, restrictasas, y ligasas [Michaels, S. D., M. C. John, and R. M. Amasino. 1994. Removal of polysaccharides from plant
- 15 DNA by ethanol precipitation. *Biotechniques*. 17:274-276.]. Esta es precisamente la situación en la que se encontrará cualquier investigador que pretenda poner a punto un método de detección basado en el DNA en muestras comerciales de goma de guar y garrofin, ya que, por definición [European, C. 1998. Commission Directive 98/86/EC of 11 November 1998. *Official Journal of the European Communities*. 9.12.98:L334/11.],
- 20 estas muestras deben contener al menos un 75% de polisacárido (galactomanano). Puesto que se han descrito un gran número de métodos e incluso de kits comerciales para solventar los problemas causados por los polisacáridos a la hora de extraer y amplificar el DNA, probamos varios de esos métodos. Probamos primero el métodos basado en el CTAB [Doyle, J., and J. J. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small
- 25 quantities of freasch leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19:11-15.] que habíamos usado con éxito aquí para extraer el DNA a partir de semillas (ver ejemplo I). También ensayamos un método de extracción basado en el SDS [Milligan, B. G. 1994. Plant DNA isolation., p. 59-98. *In* A. R. Hoelzel (ed.), *Molecular Genetic Analysis of Populations. A practical approach*. Oxford University Press, Oxford.], un método basado en el etanol [Michaels, S. D., M. C. John, and R. M. Amasino. 1994. Removal of polysaccharides from plant
- 30 DNA by ethanol precipitation. *Biotechniques*. 17:274-276.], y los kits comerciales Nucleon PhytoPure Plant DNA extraction kit (Amersham Life Science) y DNeasy Plant

kit (Qiagen). Con ninguno de esos métodos obtuvimos amplificaciones a partir de muestras comerciales de goma de guar y garrofin, y de sus mezclas. Estos resultados negativos ya habían sido descritos antes por otros autores que no obtuvieron amplificaciones a partir de goma de guar y garrofin, mientras que en la mismas

5 condiciones experimentales obtenían amplificaciones a partir de otras muestras y alimentos de origen vegetal [Allmann, M., U. Candrian, C. Höfelein, and J. Lüthy. 1993. Polymerase chain reaction (PCR): a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food. Detection of wheat contamination in non-wheat food products. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 196:248-251.]. Al referirse a los

10 resultados negativos obtenidos con la goma de guar y al garrofin, los mencionados autores dicen que "...los efectos de espesamiento y absorción hacen imposible la extracción..." del DNA. Puesto que ninguno de los métodos referidos antes produjeron resultados positivos, decidimos investigar y desarrollar nuestros propios métodos para la extracción de DNA a partir del garrofin y de la goma de guar.

15 Con este fin, ambas gomas individualmente en el rango del 0.1 a 10% en peso, o mezclas controladas de ellas, se resuspendieron en agua (método de extracción que denominaremos "agua"), o en soluciones tamponadas de diferentes composiciones y fuerza iónica (método del "Tris"), o en soluciones acetonitrilo de diferentes composiciones (método del "acetonitrilo"), o en soluciones de etanol (método del

20 "etanol"), a diferentes temperaturas entre 4 y 65 °C. Las mezclas así preparadas se agitaron entre 1 y 10 minutos y se centrifugaron. Los sobrenadantes de la centrifugación se recogieron y se utilizaron como material a amplificar en los experimentos de PCR, y además en ellos se cuantificaron el DNA y los polisacáridos. Sin embargo, en las muestras procesadas según el método del etanol, se siguió el protocolo de la referencia

25 [Michaels, S. D., M. C. John, and R. M. Amasino. 1994. Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation. *Biotechniques*. 17:274-276.], y al final, el material disuelto se utilizó para PCR y cuantificación, igual que el resto de muestras obtenidos por los demás métodos. Para la PCR utilizamos los iniciadores PG21/PG22 y las condiciones descritas en el ejemplo III. Los resultados obtenidos con los diferentes

30 métodos de extracción se recogen en la Tabla 1 y se detallan en el ejemplo IV.

Como se explica en detalle en el ejemplo IV, aunque el método del agua extrae menos DNA que el método del Tris (que es el método que extrae más DNA a partir de las dos

gomas y de sus mezclas ensayadas), el método del agua es el más adecuado para extraer DNA de estas muestras para su posterior amplificación por PCR. Por estas razones, escogimos el método del agua para posteriores experimentos de PCR.

La utilidad de los métodos de extracción y amplificación de DNA a partir de la goma de guar y garrofin, y de sus mezclas, que describimos en esta invención se comprobó mediante su ensayo en muestras controladas que contenían mezclas conocidas de goma de guar y garrofin, y también en muestras comerciales de garrofin. Para esos ensayos utilizamos el método de extracción del agua y de PCR con los iniciadores PG21/PG22. El análisis electroforético directo de los productos de amplificación o mediante restrictasas (ver ejemplo V para los detalles) demostró que: los métodos descritos en esta patente detectan la presencia de goma de guar en mezclas de garrofin y goma de guar. También demuestran que, de entre las preparaciones comerciales analizadas y etiquetadas como garrofin (o "locust bean gum"), algunas de ellas contenían goma de guar.

Los métodos descritos en esta patente se basan en la presencia de secuencias de DNA diferenciales (o diagnósticas) que son específicas del guar y del algarrobo. Dada su especificidad, estos métodos basados en el DNA aseguran el cumplimiento con los requerimientos legislativos relativos a los aditivos alimentarios E 410 y E 412 en donde se dice que ambos son galactomananos extraídos de las semillas de las especies *Ceratonia siliqua* y *Cyamopsis tetragonolobus* respectivamente. En consecuencia, un resultado adicional de la metodología que proponemos es que confirma la autenticidad de las goma de guar y garrofin que pueden obtenerse de los suministradores.

- Breve descripción de las figuras

La Figura 1A muestra la organización de las regiones 18S a 26S del rDNA. Se muestran las posiciones relativas de los iniciadores usados para la amplificación por PCR de las regiones ITS1 e ITS2, respectivamente las parejas de iniciadores ITS5/ITS2 e ITS3/ITS4. También se muestran las posiciones de la pareja de iniciadores PG21/PG22 utilizados para la amplificación específica de una región dentro de la ITS2 del rDNA del guar. Las secuencias de los iniciadores ITS5, ITS2, ITS3, e ITS4, se han descrito en la referencia [White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H.

Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed.), PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc., San Diego].

La Figura 1B muestra los resultados del análisis electroforético en geles de agarosa de los productos de amplificación por PCR del DNA extraído de las semillas de guar y algarrobo. Las muestras se amplificaron con las parejas de iniciadores ITS5/ITS2 (calles del gel marcadas 1 y 2) o con los iniciadores ITS3/ITS4 (calles 3 y 4), y por lo tanto contienen respectivamente las regiones ITS1 e ITS2. Las muestras amplificadas a partir del algarrobo se pueden ver en las calles 1 y 3, y las de guar corresponden a las calles 2 y 4. La calle marcada como St contiene fragmentos de DNA de masa molecular conocida, y sus tamaños se indican, en nucleótidos, a la izquierda de la figura. Las muestras se detectaron mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (Molecular Probes) y observación bajo luz ultravioleta.

La Figura 2 muestra la secuencia de los productos mostrados en las calles 1 y 2 de la Figura 1B, es decir de las regiones conteniendo ITS1 de guar y algarrobo. Los productos se secuenciaron usando los iniciadores ITS5 e ITS2 (encerrados en cajas en la figura). Los nombres (identificadores) de las secuencias corresponden a los que les fueron asignados por las bases de datos GenBank/EMBL/DDBJ. La secuencia con identificador AJ245575 (SEQ ID NO 8) corresponde al algarrobo, y la secuencia con identificador AJ245578 (SEQ ID NO 7) corresponde al guar. El alineamiento de las secuencias se realizó con el programa MacVector, y los guiones corresponden a posiciones vacías en las secuencias y son introducidos automáticamente por el programa para mejorar los alineamientos, mientras que los asteriscos indican posiciones conservadas en las dos secuencias. La región ITS1 está subrayada y se determinó mediante comparación de las secuencias mostradas con las secuencias publicadas de otras plantas angiospermas [Hershkovitz, M. A., and E. A. Zimmer. 1996. Conservation patterns in angiosperm rDNA ITS2 sequences. Nucleic Acids Research. 24:2857-2876.].

La Figura 3 muestra la secuencia de los productos mostrados en las calles 3 y 4 de la Figura 1B, es decir de las regiones conteniendo ITS2 de guar y algarrobo. Los productos se secuenciaron usando los iniciadores ITS3 e ITS4 (encerrados en cajas en la figura). Los nombres (identificadores) de las secuencias corresponden a los que les fueron asignados por las bases de datos GenBank/EMBL/DDBJ. La secuencia con identificador AJ245576 (SEQ ID NO 10) corresponde al algarrobo, y la secuencia con identificador AJ245577

(SEQ ID NO 9) corresponde al guar. El alineamiento de las secuencias se realizó con el programa MacVector, y los guiones corresponden a posiciones vacías en las secuencias y son introducidos automáticamente por el programa para mejorar los alineamientos, mientras que los asteriscos indican posiciones conservadas en las dos secuencias. La región ITS2 esta subrayada y se determinó mediante comparación de las secuencias mostradas con las secuencias publicadas de otras plantas angiospermas [HersHKovitz, M. A., and E. A. Zimmer. 1996. Conservation patterns in angiosperm rDNA ITS2 sequences. Nucleic Acids Research. 24:2857-2876.]. También se muestran las secuencias de los iniciadores PG21 y PG22 diseñados como parte de esta patente.

La Figura 4 muestra un ejemplo de análisis mediante restrictasas de las regiones conteniendo ITS1 extraídas y amplificadas a partir de semillas de algarrobo y de guar. La región conteniendo ITS1 se amplificó mediante PCR con los iniciadores ITS5/ITS2 y se digirió con los enzimas *BcnI*, *ClaI*, y *HaeIII* (calles 1 y 2, 3 y 4, 5 y 6, respectivamente). Las calles impares corresponden a amplificaciones del algarrobo, mientras que las pares provienen del guar. Los productos de restricción se detectaron como en la Figura 1B. La calle marcada como St contiene fragmentos de DNA de masa molecular conocida, y sus tamaños se indican, en nucleótidos, a la izquierda de la figura.

La Figura 5 muestra un ejemplo de análisis mediante restrictasas de las regiones conteniendo ITS2 extraídas y amplificadas a partir de semillas de algarrobo y de guar. La región conteniendo ITS2 se amplificó mediante PCR con los iniciadores ITS3/ITS4 y se digirió con los enzimas *SmaI*, *XhoI*, y *HaeIII* (calles 1 y 2, 3 y 4, 5 y 6, respectivamente). Las calles impares corresponden a amplificaciones del algarrobo, mientras que las pares provienen del guar. Los productos de restricción se detectaron como en la Figura 1B. La calle marcada como St contiene fragmentos de DNA de masa molecular conocida, y sus tamaños se indican, en nucleótidos, a la izquierda de la figura.

La Figura 6 muestra el análisis electroforético de los productos de amplificación por PCR con los iniciadores PG21/PG22 del DNA extraído de las semillas de guar (calles 1 a 3). El DNA extraído de las semillas de algarrobo también se intentó amplificar por PCR con las mismas condiciones e iniciadores que el DNA extraído del guar, pero no se detectó amplificación (calles 4 a 7). Los productos de amplificación se detectaron como en la Figura 1B. La calle marcada como St contiene fragmentos de DNA de masa molecular conocida, y sus tamaños se indican, en nucleótidos, a la izquierda de la figura.

La **Figura 7** muestra el análisis electroforético de los productos de amplificación mediante PCR del DNA extraído de la goma de guar y garrofin y mezclas de ambas gomas. El DNA se extrajo mediante el método del agua y se amplificó con los iniciadores PG21/PG22. Las calles 1 y 2 muestran los productos de amplificación de muestras
5 controles negativas y positivas, respectivamente DNA extraído de garrofin (calle 1) y goma de guar (calle 2). Las calles 3, 4, y 5, muestran los productos de amplificación obtenidos a partir del DNA extraído de mezclas de garrofin conteniendo un 30%, 20%, y 10% de guar, respectivamente. Las calles 6, 7, y 8, muestran las amplificaciones
10 obtenidas a partir de mezclas de garrofin conteniendo goma de guar al 12%, 6%, y 2%, respectivamente. Las mezclas fueron preparadas en el laboratorio a partir de las gomas analizadas: el garrofin utilizado para todas las mezclas fue el analizado en la calle 1, la goma de guar utilizada para las mezclas mostradas en las calles 3 a 5 fue el analizado en la calle 2, mientras que las mezclas analizadas en las calles 6 a 8 se prepararon con otra goma de guar diferente.

15 **La Figura 8** muestra el análisis electroforético de los productos de amplificación obtenidos a partir de diversas muestras comerciales de garrofin adquiridas de diferentes suministradores, y etiquetadas como "garrofin" o "locust bean gum". El DNA se extrajo de las muestras con el método del agua y se amplificó por PCR con los iniciadores PG21/PG22. Las calles contienen los productos de amplificación de las muestras
20 comerciales (calles 1 a 5), del control negativo (garrofin, calle 6), y del control positivo (goma de guar, calle 7).

Figura 9. Análisis de los productos de amplificación de los productos analizados en la Figura 8 mediante las restrictasas *TaqI* (calles 2 a 4) y *XhoI* (calles 5 a 7). Las calles 2 y 5, 3 y 6, y 4 y 7, contienen respectivamente las restricciones de los productos analizados
25 en las calles 2, 5, y 7 de la Figura 8. La calle 1 muestra el producto sin digerir obtenido a partir del guar control (calle 7 de la Figura 8).

Ejemplo I

Amplificaciones y secuencias de las ITS1 e ITS2 del DNA extraído de las semillas del
30 guar y el garrofin

Las semillas de guar y algarrobo se escarificaron mecánicamente, fueron embebidas en agua estéril durante unas 16 horas, y luego germinadas sobre papel húmedo dentro de

placas de Petri. El DNA se extrajo a partir de 20 mg de tejido vegetal usando el protocolo del CTAB detallado en la referencia [Doyle, J., and J. J. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of freasch leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19:11-15.]. El contenido en DNA de las muestras se cuantificó en un fluorímetro usando los reactivos del PicoGreen^R dsDNA Quantitation Kit de Molecular Probes. Las regiones del rDNA que contienen las regiones ITS1 e ITS2 se amplificaron independientemente mediante PCR con las parejas de iniciadores ITS5/ITS2 e ITS3/ITS4 respectivamente. Las secuencias de los iniciadores se pueden ver en la Figura 1A y están tomadas de la referencia [White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed.), *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc., San Diego]. Los parámetros de la reacción de PCR (35 ciclos) fueron de 90 segundos a 94 °C, 90 segundos a 56 °C, y 90 segundos a 72 °C, cada ciclo, y una extensión final de 10 minutos a 72 °C. Las mezclas de reacción contenían: 250 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada iniciador, 1,25 unidades de Taq polimerasa, y 100 ng de DNA extraído de las semillas, todo ello ajustado a un volumen final de 50 µl con el tampón 1x de la DNA polimerasa suministrado por Pharmacia. Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión, y se purificaron a partir de esos geles mediante el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) o mediante Agarasa (Roche). El análisis por electroforesis en geles de agarosa se realizó en geles conteniendo 3% de agarosa en tampón 1xTAE y la detección se realizó mediante tinción con SYBR[®] Gold Nucleic Acid Gel Stain (Molecular Probes) y observación bajo luz ultravioleta.

La Figura 1B muestra el análisis electroforético de los productos de amplificación obtenidos a partir del DNA extraído de las semillas de algarrobo (calles impares) y de guar (calles pares). Las amplificaciones mostradas en las calles 1 y 2 se realizaron con los iniciadores ITS5/ITS2, y por lo tanto dan como resultado regiones del rDNA conteniendo ITS1. Las amplificaciones mostradas en las calles 3 y 4 se realizaron con los iniciadores ITS3/ITS4, y por lo tanto dan como resultado regiones del rDNA conteniendo ITS2.

Los productos visualizados en la Figura 1B se secuenciaron con un secuenciador Automated Applied Biosystems DNA Sequencer usando el método del terminador fluorescente y los métodos recomendados por el fabricante. Los productos de

amplificación se secuenciaron directamente o se clonaron en el vector pGEM-T de Promega y luego se secuenciaron. En el segundo caso, para determinar la secuencia, se secuenciaron al menos 3 clones de cada producto de amplificación. Para la secuenciación se usaron los siguientes iniciadores mostrados en la Figura 1A: ITS5 e ITS2 para
5 secuenciar los productos conteniendo la región ITS1 (calles 1 y 2 de la Figura 1B), y los iniciadores ITS 3 e ITS4 para secuenciar los productos conteniendo la región ITS2 (calles 3 y 4 de la Figura 1B).

Las Figuras 2 y 3 muestran las secuencias resultantes obtenidas y alineadas mediante el programa MacVector. Los identificadores o nombres de las secuencias corresponden a los
10 números de acceso asignados por las bases de datos GenBank/EMBL/DDBJ. Las zonas adyacentes a ITS1 e ITS2 se determinaron por comparación de nuestras secuencias con las de otras plantas angiospermas [Hershkovitz, M. A., and E. A. Zimmer. 1996. Conservation patterns in angiosperm rDNA ITS2 sequences. Nucleic Acids Research. 24:2857-2876.]. Como se muestra en las Figuras 2 y 3, existen varias posiciones en las
15 secuencias alineadas en las que hay nucleótidos diferentes según que la secuencia corresponda al algarrobo o al guar. Además, las secuencias obtenidas a partir de las semillas de ambas plantas tienen diferente longitud, tanto para la región conteniendo ITS1 (la ITS1 del guar tiene 2 nucleótidos más que la correspondiente del algarrobo), como para la región conteniendo ITS2, que es 5 nucleótidos más larga en el algarrobo que en el
20 guar. Esas diferencias de longitud serían por sí mismas suficientes para discernir si los productos de amplificación provienen del guar o del algarrobo, utilizando métodos que son conocidos en el campo de la biología molecular.

Ejemplo II

25 Identificación del guar y el garrofin mediante amplificación de las ITS1 e ITS2 obtenidas a partir del DNA de sus semillas y restricción

La amplificación de las regiones conteniendo ITS1 e ITS2 a partir del DNA de las semillas de guar y algarrobo se obtuvo como en el ejemplo anterior. Los productos de amplificación se purificaron de los otros componentes de la reacción de PCR mediante el
30 High PureTM PCR Product Purification Kit de Boehringer. Las restricciones de los productos purificados se realizaron con los enzimas de restricción detallados en la Figuras 4 y 5 y en las condiciones recomendadas por los suministradores de las restrictasas

(Boehringer, Pharmacia). Los productos de restricción resultantes se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 4% en 1xTAE, y se detectaron y visualizaron como en otros análisis electroforéticos anteriores.

La Figura 4 muestra los resultados de los análisis de restricción de las regiones
5 conteniendo ITS1 amplificadas a partir de las semillas de algarrobo (calles impares) y guar (calles pares). Las restricciones se realizaron con los enzimas *BcnI* (calles 1 y 2), *ClaI* (calles 3 y 4), y *HaeIII* (calles 5 y 6). Como puede observarse fácilmente en la figura, el DNA del guar en esta región puede diferenciarse del DNA de esta misma región del algarrobo mediante este tipo de análisis. Por ejemplo, *BcnI* no corta en esta región del
10 DNA del algarrobo, mientras que en la misma región del guar el enzima genera dos fragmentos de 247 y 98 nucleótidos.

La Figura 5 muestra el mismo tipo de análisis mostrado en el párrafo anterior pero aplicado a los productos de amplificación que contienen las regiones ITS2. Como muestra esta figura, por ejemplo, el enzima *SmaI* genera dos fragmentos de 298 y 112 nucleótidos
15 en la región conteniendo ITS2 del algarrobo (calle 1), mientras que no corta en esa región del guar (calle 2).

Los ejemplos mostrados en las dos figuras anteriores no son limitantes, es decir que con la misma metodología pero usando otras restrictasas obtenibles comercialmente podrían obtenerse patrones de restricción diferentes a partir del DNA de las dos plantas
20 estudiadas. En este tipo de análisis, para predecir los fragmentos de restricción que se generarían según los diferentes enzimas, podemos ayudarnos de ensayos de restricción virtuales realizados con programas como MacVector u otros.

Ejemplo III

25 Diseño y utilización de iniciadores de la PCR específicos del DNA extraído de semillas de guar

El DNA extraído de semillas control de guar y algarrobo se extrajo mediante el método del CTAB como en el ejemplo I y se amplificó mediante los iniciadores PG21/PG22 utilizando las mismas condiciones que en el ejemplo I, excepto que la temperatura de
30 anillado fue de 55 °C. Los productos de amplificación se detectaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 3% en tampón 1xTAE, y se visualizaron mediante

tinción con bromuro de etidio o con SYBR[®] Gold Nucleic Acid Gel Stain (Molecular Probes).

La Figura 6 muestra los resultados de este tipo de experimentos y demuestra que los iniciadores PG21 y PG22 amplifican específicamente el DNA extraído del guar y no del
5 algarrobo. Los fragmentos de amplificación deberían tener una longitud de exactamente 194 nucleótidos, como se deduce de la secuencia AJ245577 entre los nucleótidos denominados PG21 y PG22 (ver Figura 3). Como puede observarse en la Figura 6, el producto amplificado a partir de los DNA extraído de diferentes semillas de guar se localiza en los geles de agarosa ligeramente por debajo del marcador de 200 nucleótidos,
10 y por lo tanto su tamaño coincide con el esperado según la secuencia.

Ejemplo IV

Extracción de DNA de la goma de guar y garrofin y de sus mezclas

La extracción del DNA de la goma de guar y garrofin y de mezclas de ambas gomas se
15 realizó como sigue. Se resuspendieron 10 mg de la goma, que se obtiene de los proveedores comerciales en forma de polvo, en 10 ml de agua (método del agua), o de una solución 10 mM de Tris-HCl pH 8,5 (método del Tris), o de una solución de agua y acetonitrilo en la proporción 7:3 (método del acetonitrilo), o en etanol al 35% (método del etanol). Las suspensiones se agitaron durante 5 minutos con un agitador de tubos de
20 ensayo (vórtex) y se centrifugaron durante 1 minuto a 15.000 x g. Los sobrenadantes de la centrifugación se recogieron y usaron para posteriores experimentos de PCR y cuantificación, excepto en el caso de la muestra extraída por el método del etanol donde se siguió el protocolo detallado en la referencia [Michaels, S. D., M. C. John, and R. M. Amasino. 1994. Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation.
25 Biotechniques. 17:274-276.], y el precipitado final se disolvió en 0,5 ml de agua. Para la cuantificación del DNA extraído siguiendo los cuatro métodos anteriores, se utilizaron 0,1 ml de los extractos y el PicoGreen[®] dsDNA Quantitation Kit de Molecular Probes. Para la cuantificación de las hexosas totales se utilizaron 0,01 ml de los extractos y el método de cuantificación del fenol-sulfúrico [Keleti, G., and W. H. Lederer. 1974. Handbook of
30 Micromethods in the Biological Sciences. Van Nostrand Reinhold, New York.]. Para la amplificación por PCR, se utilizaron 0,005 ml de los extractos y los iniciadores

PG21/PG22 y las condiciones de PCR descritas en el ejemplo III. Los resultados obtenidos con los diferentes métodos de extracción se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1

Detección específica de la goma de guar, sola o en mezclas con garrofin, mediante PCR del DNA extraído de las gomas. Dependencia de la detección según el método de extracción del DNA.

Gomas	Método de extracción	DNA ¹	Hexosas ²	DNA/polisacárido	PCR ³
Guar	H ₂ O	46.87	0.639	1 / 14,000	+
30% Guar ⁴	H ₂ O	8.6	0.523	1 / 60,000	+
10% Guar ⁴	H ₂ O	10.8	0.541	1 / 50,000	+
Garrofin	H ₂ O	14.22	0.572	1 / 40,000	-
Guar	Tris	77.3	1.056	1 / 14,000	+
30% Guar	Tris	156.1	0.361	1 / 2,500	-
10% Guar	Tris	232.5	0.494	1 / 2,000	-
Garrofin	Tris	509.7	0.721	1 / 1,500	-
Guar	Acetonitrilo	4.84	0.013	1 / 3,000	+
30% Guar	Acetonitrilo	1.72	0.019	1 / 11,000	-
10% Guar	Acetonitrilo	1.94	0.030	1 / 16,000	-
Garrofin	Acetonitrilo	1.72	0.029	1 / 17,000	-
Guar	Etanol	3.21	ND ⁵	NA ⁶	-
30% Guar	Etanol	0.3	ND	NA	-
10% Guar	Etanol	0.64	ND	NA	-
Garrofin	Etanol	0.86	ND	NA	-

¹En ng/ml. Cuantificados mediante el PicoGreen^R dsDNA Quantitation Kit de Molecular Probes. ²En mg of polisacárido disuelto detectado (mediante el método del fenol-

10 sulfúrico) por mg de goma. ³Amplificación (+) o no amplificación (-) por PCR con los iniciadores PG21/PG22 y detección como en la Figura 1B. ⁴Porcentaje (en peso) de goma de guar en la mezcla goma de guar-garrofin. ⁵No detectado. ⁶No aplicable.

Como se muestra en la Tabla 1, los cuatro métodos de extracción ensayados tienen diferentes eficiencias de extracción de DNA a partir de la goma de guar y garrofin. Claramente, de los resultados obtenidos se concluye que el método del Tris es el más eficiente, seguido de los métodos del agua, del acetonitrilo, y del etanol. Las eficiencias en la extracción de DNA no siempre están relacionadas directamente con la cantidad de polisacárido disuelto, como puede deducirse de la columna de la Tabla que muestra las relaciones DNA/polisacárido obtenidas con cada método de extracción. Cuando se extraen gomas individuales (100% de goma de guar o garrofin), está claro que el método del Tris es mucho más eficiente que el resto de los métodos, y en particular extrae más eficientemente el DNA del garrofin que de la goma de guar. Esto último puede deducirse de los cocientes entre el DNA extraído por el método del Tris y por el método del agua. Estos cocientes son de 35,8 para el garrofin, y de sólo 1,6 para el guar.

Los resultados anteriores permiten entender los resultados que se obtuvieron cuando se extrajo DNA de mezclas de garrofin conteniendo un 30% ó un 10% de guar, y también los resultados obtenidos al amplificar por PCR los productos resultantes de las diferentes extracciones de DNA. Claramente, aunque el método del agua extrae menos DNA que el método del Tris, a partir de cualquier goma o de cualquier mezcla de ellas, el método del agua es el más adecuado para amplificar por PCR el DNA extraído de la goma de guar, del garrofin, y de sus mezclas. Esto se demuestra en la columna denominada "PCR" en la Tabla 1, donde se recogen los resultados obtenidos mediante amplificación por PCR con los iniciadores PG21/PG22. Como puede observarse en esa columna de la Tabla, aunque el método del Tris extrae más DNA que el método del agua a partir de mezclas de garrofin conteniendo 30% ó 10% de guar, sólo cuando esas mezclas se extrajeron con el método del agua pudo obtenerse amplificación. Los resultados de estas extracciones y amplificaciones sugieren que la mayor parte del DNA extraído por el método del Tris a partir de mezclas de goma de guar y garrofin debe corresponder de hecho a DNA que proviene del garrofin, y que sin embargo con el método del agua debe extraerse suficiente DNA de la goma de guar contenido en la mezcla de gomas como para permitir su amplificación por PCR con los iniciadores PG21/PG22.

En resumen, los resultados obtenidos aconsejan utilizar el método de extracción del agua cuando se pretende detectar el guar presente en mezclas de goma de guar y garrofin mediante los métodos de PCR descritos aquí.

Ejemplo V

Detección específica del DNA de guar en gomas de guar y en mezclas de goma de guar y garrofin.

En este ejemplo estudiamos mezclas de laboratorio de garrofin con diferentes contenidos en goma de guar y también muestras comerciales de garrofin. Los métodos utilizados son la extracción de las muestras con el método del agua descrito en el ejemplo anterior y la amplificación por PCR con los primers PG21/PG22 descrito en ejemplos anteriores. Los resultados se muestran en las Figuras 7 y 8.

La Figura 7 muestra los resultados del estudio de mezclas de laboratorio de garrofin conteniendo 30%, 20%, y 10% de goma de guar. Esas tres muestras se hicieron utilizando las mismas dos muestras de goma de guar y garrofin. Pensando que quizás diferentes proveedores producen gomas de guar con diferentes contenidos en DNA, dependiendo de su proceso de fabricación u otras razones, también preparamos mezclas de garrofin con otra goma de guar distinta. Estas mezclas de garrofin contenían 12%, 6%, y 2% de goma de guar. Como muestra la Figura 7, todas las mezclas de garrofin conteniendo goma de guar produjeron por PCR con los iniciadores PG21/PG22 un producto de amplificación del tamaño esperado para el guar, independientemente de la proporción de guar presente en la mezcla. Las muestras control conteniendo exclusivamente garrofin o goma de guar produjeron los resultados esperados: no amplificaron en el caso del garrofin, y amplificaron en el caso de la goma de guar. Es interesante hacer notar que, confirmando nuestras sospechas, diferentes muestras comerciales de guar contienen diferentes cantidades de DNA. Este hecho puede deducirse si se comparan los resultados obtenidos en las amplificaciones de las mezclas de garrofin conteniendo goma de guar al 2% y al 10% (calles 8 y 5 de la Figura 7, respectivamente). Esas dos mezclas se obtuvieron mezclando el mismo garrofin con goma de guar de dos proveedores distintos.

La utilidad de los métodos que acabamos de describir para detectar la goma de guar también se demostró en preparaciones comerciales etiquetadas como "garrofin" o su denominación en inglés "locust bean gum". Obtuvimos esas muestras comerciales de varios proveedores y seleccionamos algunas de ellas para su estudio por los métodos que describimos aquí. En concreto, seleccionamos aquellas muestras que producían viscosidades por encima de 250 cps a temperatura ambiente, ya que el garrofin en esas condiciones suele producir viscosidades no mayores de 100 cps, y que por lo tanto podría

sospechase que las altas viscosidades podrían provenir de la presencia inadvertida o no declarada de goma de guar. Como ilustra la Figura 8, cuatro de las cuatro muestras de, teóricamente, garrofin, produjeron amplificaciones por PCR con los iniciadores PG21/PG22 específicos del guar (calles 2 a 5 de esta Figura). Estos resultados demuestran
5 que las cuatro muestras mencionadas contienen goma de guar, aunque en diferentes proporciones, como puede deducirse de las diferentes intensidades de las bandas observadas en el gel (comparar por ejemplo las calles 2 y 3). Las gomas control de garrofin y guar produjeron los resultados esperados de no amplificación (calle 6) y amplificación (calle 7). Una muestra comercial etiquetada como "garrofin" pero que
10 producía los valores de viscosidad esperados para el garrofin, también produjo los resultados esperados de no amplificación por PCR.

Obtuvimos una evidencia adicional del contenido en guar en preparaciones comerciales etiquetadas como "garrofin" mediante restricción de los productos de amplificación mencionados en el párrafo anterior. Para diseñar y realizar este análisis seguimos las
15 direcciones y métodos utilizadas en el ejemplo II y la secuencia AJ245577 mostrada en la Figura 3. Como se muestra en la Figura 9, los productos de amplificación mostrados en la Figura 8 contienen dos puntos de restricción para la restrictasa *TaqI*, que genera tres fragmentos de 106, 52 y 36 nucleótidos. El mismo enzima generaría, según ensayos de restricción por ordenador, sólo dos fragmentos de restricción de 143 y 52 nucleótidos en
20 la región de amplificación equivalente del algarrobo, es decir en la secuencia comprendida entre los iniciadores PG21 y PG22. Adicionalmente, el enzima *XhoI*, que no corta en la secuencia del algarrobo, produce dos fragmentos en las muestras amplificadas, los mismos dos fragmentos que cabe esperar de la restricción con este enzima del DNA de guar entre los iniciadores PG21 y PG22. Por lo tanto, las restrictasas utilizadas en este
25 ejemplo son diagnósticas, pero también podrían serlo otros enzimas de restricción, tal como discutimos en el ejemplo II.

Reivindicaciones

1. Procedimientos para la diferenciación entre las semillas de las especies vegetales *Cyamopsis tetragonolobus* (o *Cyamopsis tetragonoloba*) y *Ceratonia siliqua* **caracterizados** porque se realizan a través de comprobar las diferencias del rDNA extraído a partir de las semillas de esas dos especies, mediante las siguientes operaciones:
- 5 i) se germinan las semillas y se extraen los DNA de ellas,
- ii) los DNA extraídos se amplifican por PCR mediante los iniciadores ITS2, ITS3, ITS4, e ITS5, que son específicos del rDNA, y que se utilizan combinados según las parejas ITS5/ITS2 e ITS3/ITS4, y
- 10 iii) se detectan los rDNA productos de la amplificación.
2. Procedimientos para la detección de las diferencias en los rDNA amplificados a partir de las semillas por los procedimientos descritos según la reivindicación 1 **caracterizados** porque los rDNA productos de la amplificación se secuencian y se comparan con las
- 15 secuencias del rDNA del guar y algarrobo descritas en esta patente, de manera que por su mayor o menor identidad con ellas puede deducirse si la secuencia obtenida a partir de una semilla incógnita corresponde al guar o al algarrobo. Dichas secuencias corresponden a las denominadas AJ245575 y AJ245576 en el caso del algarrobo, y AJ245577 y AJ245578 en el caso del guar.
- 20 3. Procedimientos para la detección de las diferencias en los rDNA amplificados a partir de las semillas por los procedimientos descritos según la reivindicación 1 **caracterizados** porque sin requerir la secuenciación, se aprovechan las diferencias en las secuencias descritas en la reivindicación 2 para identificar el rDNA amplificado como proveniente
- 25 del guar o el algarrobo, y que consiste en que los rDNA productos de la amplificación se,
- i) digieren con enzimas de restricción que producen fragmentos diferentes según la secuencia digerida, como por ejemplo, pero no exclusivamente, los enzimas *BcnI*, *ClaiI*, *HaeIII*, *XhoI* ó *SmaI*,

ii) los productos de la digestión se separan mediante, por ejemplo, electroforesis en geles de agarosa y se visualizan mediante tinción con SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (Molecular Probes), bromuro de etidio u otro reactivo para la detección de DNA, y

5 iii) se comparan los productos de restricción visualizados en los geles con los obtenidos a partir de los controles de guar y algarrobo, de manera que la coincidencia con los patrones de restricción del rDNA amplificado a partir de una u otra planta permiten asignar el rDNA amplificado y digerido a partir de una semilla incógnita a una de las dos especies vegetales citadas.

10

4. Procedimientos para la detección específica de las semillas de guar, basados en diferencias en las secuencias del rDNA del guar y el algarrobo descritas en la reivindicación 2 **caracterizados** porque

15 i) se comparan las mencionadas secuencias mediante alineamiento de las mismas y se diseñan a partir de las secuencias de guar oligonucleótidos dirigidos contra ella, idénticos o similares a regiones de ella en las que hay diferencias con las secuencias equivalentes del algarrobo, como por ejemplo las secuencias PG21 y PG22 descritas en esta patente,

20 ii) dichos oligonucleótidos se utilizan como iniciadores para la amplificación por PCR del DNA extraído de las semillas de guar, de algarrobo o de semillas incógnitas que se sospecha puedan pertenecer a una de esas dos especies vegetales, y

25

iii) los DNA productos de la amplificación se detectan mediante cualquiera de los métodos descritos en las reivindicaciones 2 y 3.

30

5. Procedimientos para la detección de goma de guar (E 412) individualmente o mezclada con goma de garrofin (E 410) **caracterizados** porque se extrae el DNA de esas gomas o sus mezclas, se amplifica por PCR, y se detectan los productos de amplificación correspondientes al guar.

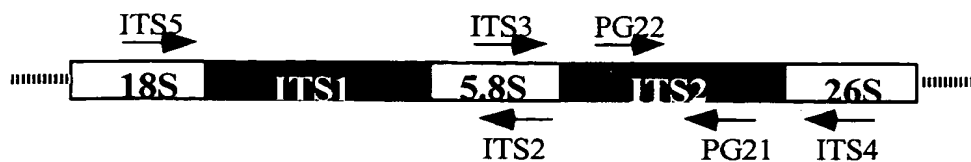
35

6. Procedimientos para la extracción del DNA de las gomas de guar ó E 412 y de garrofin ó E 412, y de sus mezclas, **caracterizados** porque

- 5 i) se pesa una cierta cantidad de esas gomas o sus mezclas y resuspende en un cierto volumen de, preferentemente, agua, o de una solución acuosa tamponada o no, conteniendo o no otros componentes como acetonitrilo o etanol,
- ii) se agita durante un tiempo variable, preferentemente 5 minutos, a temperatura variable entre 0 °C y 100 °C, preferentemente a temperatura ambiente,
- 10 iii) se separa el material soluble por decantación o preferiblemente por centrifugación, por ejemplo a 15.000 x g durante 1 minuto, y
- iv) se toma una muestra del material soluble, es decir la fase superior de la decantación o centrifugación, para su amplificación por PCR.

- 15 7. Procedimientos para la amplificación por PCR y detección de los productos de amplificación de los DNA extraídos de las gomas de guar y garrofin y de sus mezclas según los métodos de la reivindicación 6 y **caracterizados** porque se utilizan los métodos descritos en las reivindicaciones 2, 3, y 4.

1/9



ITS5: GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
ITS3: GCATCGATGAAGAACGCAGC
ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS2: GCTGCGTTCTTCATCGATGC
PG21: TCCAAAACAAGATGGAGTCG
PG22: TGCCTGGGCGTCGCGCGTC

Figura 1A

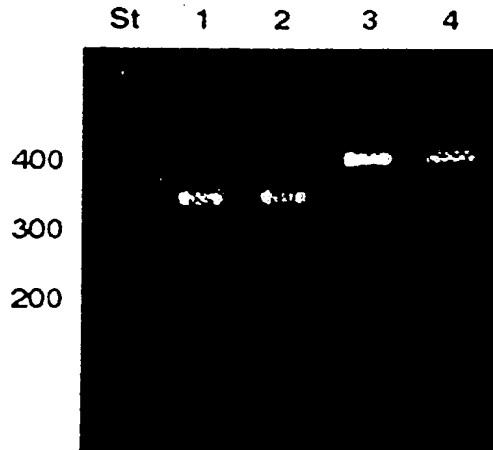


Figura 1B

2/9

ITS5

AJ245578 1 TGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT 50
AJ245575 1 TGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGTGGAAGGAT 50

5
AJ245578 51 CATTGTCGATGCCTCACAAGCAGTCCGACCCGTGAACTTGTTTTGCTTAT 100
AJ245575 51 CATTGTCGATGCCTCACAAGCAGTCCGACCCGTGAACTTGTTTTGCTTAT 99

10
AJ245578 101 TTAGGGTTGGTTTGGGGCGTGTCAAAACACGCCGACCTTCCTTTGGTTGG 150
AJ245575 100 CGGGGGCGGG--GGGCGTGCCTCCTCCAAGCCTCCATGTGCGGAGGCGC 147
*** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * *
15
AJ245578 151 GAGTTGTCTGCCTTGCCTGGCTTTCTCTTAGCCTTTAACAAACCCACCGG 200
AJ245575 148 CTGTGGCCCCCGCCACTCGTGCTACCTCGACCAAACTAACC-CTGG 196
* * * * * * * * * * * * * * * * * *
20
AJ245578 201 CGCTACACGCGCCAAGGAACTTAACTNTTCTGTGCGCCCTTGCCAGCCC 250
AJ245575 197 CGTTTAAACGCGCCAAGGAACTACAACAGTGAGCGTGCTCCCGATGACCT 246
* * * * * * * * * * * * * * * * * *
25
AJ245578 251 GGTAACGGTGCTGTGTAGGTT-GNGTTTAGATACATGAATC-AAAATGAC 298
AJ245575 247 GGTAACGGCGATCGATCGATGAGCGTCGTGACATTCTTATCCAAAATGAC 296
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * *
30
AJ245578 299 TCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCA 345
AJ245575 297 TCTCGGTAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCA 343

ITS2

Figura 2

			ITS3		
	AJ245577	1	<u>TGCATCGATGAAGAACGCAGC</u> GAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGA	50	
5	AJ245576	1	TGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCAATACTTGGTGTGAATTGCAGA	50	

	AJ245577	51	ATCCCGCGAACCTTCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTA	100	
10	AJ245576	51	ATCTTGTGAACCATCAAGTCTTTGAACACAAGTTGTGCCCGAAGCCATCA	100	
			*** * *****		
			PG22		
	AJ245577	101	GGCCGAGGGCACGCC <u>TGCCTGGGCGTCGCGCGTC</u> GTTGCCCTAACTCGG-	149	
	AJ245576	101	AGCCGAAGGCACGTCTGCCTGGGTGTCAACACTGTCGCCCCCACCCTCGT	150	
15			*****		
	AJ245577	150	-ACGTCTCATTGGTGTGCTTGAAGTTCGAGTCCGTGGTGGAGGATGCCACGA	197	
	AJ245576	151	<u>GGCCTCTCGCGTGGCTTCGAGGAATGGGCAGATTATGGCCTTCCGTGAGC</u>	200	
			* ****		
20	AJ245577	198	GTTGCCTCATGGTTGGTTGAAATTCGAGTCCGTGGTGGAGGATGCCACGA	247	
	AJ245576	201	<u>TTCGCCTTATGGATGGCCCAAAGAGAGTTGCGCGTGGCGACTGCCACGA</u>	250	
			* ****		
			PG21		
	AJ245577	248	TTGATATGGTGGTTGAGTAATTAGCTCGAGACCCATCGTGAG <u>CGACTC-C</u>	296	
25	AJ245576	251	<u>C--GCACGGTGGATGAGCAAAGA-CTCAAGACCAGTCGTGCAAGTGTCAT</u>	297	
			* ****		
			PG21		
	AJ245577	297	<u>ATCTTGTTTTGGACTCTTTGACCC</u> ---ACATGAGCATCTCCG-ATGCTC	341	
30	AJ245576	298	<u>ACCCGGGATTGCGCTCGGAGACCCTTCAGCATCGCGAGGTGCATATGCCT</u>	347	
			* * * ****		
	AJ245577	342	GTTACGAGACCTCAGGTCAGACGGGGTTACCCGCTGAGTTTAA <u>GCATATC</u>	391	
	AJ245576	348	<u>CGAACGGGACCCTAAGTCAGGCGGGGCTACTCGCTGAGTTTAAGCATATC</u>	397	
35			*** ****		
			ITS4		
	AJ245577	392	<u>AATAAGCGGAGGA</u> A	405	
	AJ245576	398	AATAAGCGGAGGA	410	

40			ITS4		

Figura 3

WO 01/66794

PCT/ES01/00079

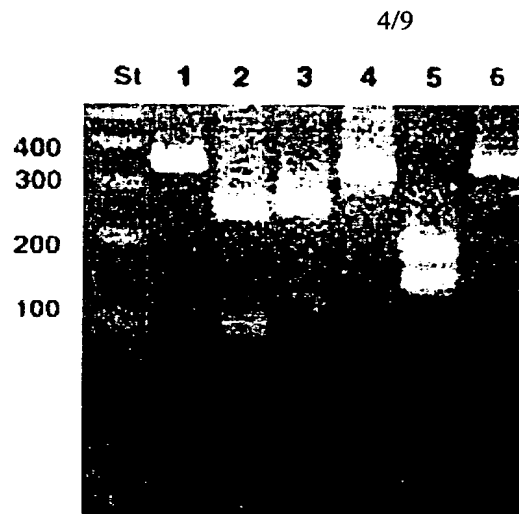


Figura 4

WO 01/66794

PCT/ES01/00079

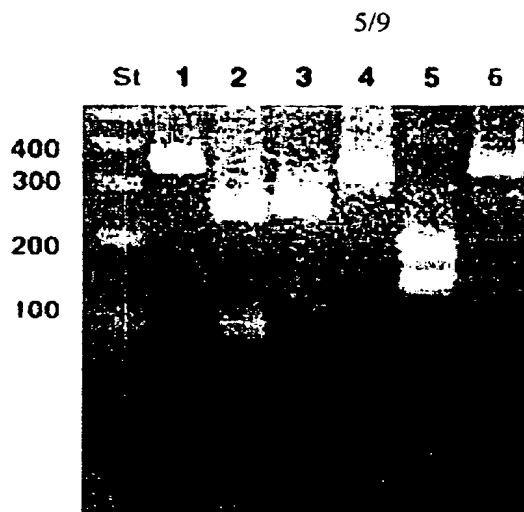


Figura 5

WO 01/66794

PCT/ES01/00079

6/9

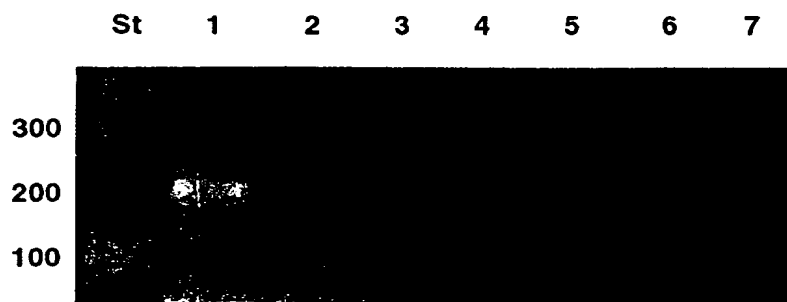


Figura 6

WO 01/66794

PCT/ES01/00079

7/9

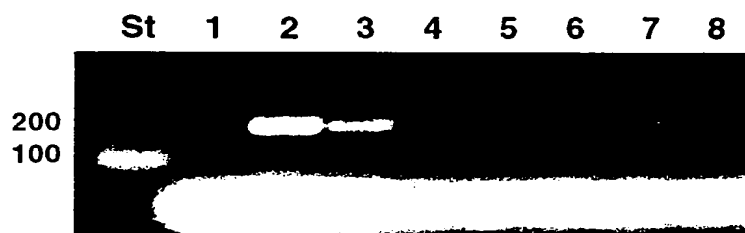


Figura 7

WO 01/66794

PCT/ES01/00079

8/9

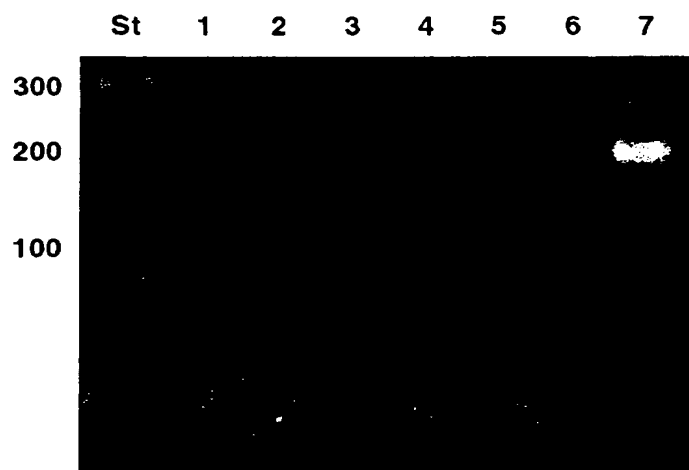


Figura 8

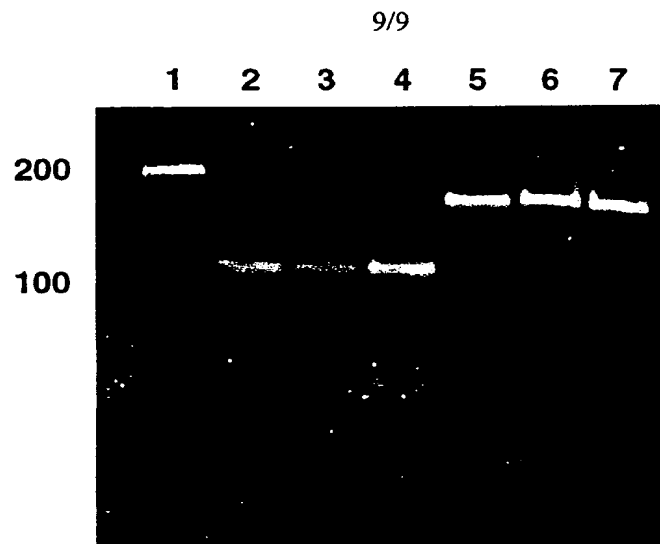


Figura 9

WO 01/66794

PCT/ES01/00079

1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

5 <120> METODOS MOLECULARES PAA LA DETECCION DE ADICIONES DE
GOMA DE AL GARROFIN

<130> SOLICITUD DE PATENTE PCT/ES01/00079

10 <140> PCT/ES01/00079
<141> 2001-03-02

<150> ES2000000560
<151> 2000-03-08

15 <160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

20 <210> 1
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo ITS5

<400> 1
ggaagtaaaa gtcgtaacaa gg 22

30

<210> 2
<211> 20
<212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial:oligo ITS3

40 <400> 2
gcatcgatga agaacgcagc 20

<210> 3
<211> 20
<212> ADN

45 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial:oligo ITS4

50 <400> 3
tcttccgctt attgatatgc 20

55

<210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

```

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial:oligo PG21

5  <400> 4
    gctgcgttct tcatcgatgc
                                     20

    <210> 5
10  <211> 20
    <212> ADN
    <213> Secuencia Artificial

    <220>
15  <223> Descripción de la Secuencia Artificial:oligo ITS2

    <400> 5
    tccaaaacaa gatggagtcg
                                     20

20  <210> 6
    <211> 19
    <212> ADN
    <213> Secuencia Artificial

25  <220>
    <223> Descripción de la Secuencia Artificial:oligo PG22

    <400> 6
30  tgccctggggcg tcgcgcgctc
                                     19

    <210> 7
    <211> 345
35  <212> ADN
    <213> Cyamopsis tetragonoloba

    <220>
    <221> primer_bind
40  <222> Complement((2)..(23))

    <220>
    <221> primer_bind
45  <222> (325)..(344)

    <400> 7
    tggaaggaga agtcgtaaca aggtttccgt aggtgaacct gcggaaggat cattgtcgat 60
    gcctcacaag cagtcgcgacc cgtgaacttg ttttgcttat ttagggttgg tttggggcgt 120
50  gtcaaaacac gccgaccttc ctttggttgg gagttgtctg ccttgcgtgg ctttctctta 180
    gcctttaaca aaccaccgg cgctacacgc gccaaaggaaa cttaactntt ctgtgcgccc 240
    ttgccagccc ggtaacggtg ctgtgtaggt tngttttaga tacatgaatc aaaatgactc 300
    tcggcaacgg atatctcggc tctcgcatcg atgaagaacg cagca
                                     345

55  <210> 8
    <211> 343
    <212> ADN
    <213> Ceratonia siliqua

```

```

<220>
<221> primer_bind
<222> (2)..(23)
5
<220>
<221> primer_bind
<222> Complement((323)..(342))

10 <400> 8
    tggaaggaga agtcgtaaca aggttttcgt aggtgaacct gtggaaggat cattgtcgat 60
    gcctcacaaa acgaacgacc tgcgaattgg ttaaactatc gggggcgggg ggcgtgcgtc 120
    ctcccaagcc tccatgtcgg gaggcgcctg tggcccccgc ccactcgtgc tacctcgacc 180
    aaaaaactaa ccctggcggt taacgcgcca aggaactaca accagtgagc gtgctcccga 240
15   tgacctggta acggcgatcg atcgatgagc gtcgtgacat tcttatccaa aatgactctc 300
    ggtaacggat atctcggctc tcgcatcgat gaagaacgca gca 343

<210> 9
20 <211> 405
    <212> ADN
    <213> Cyamopsis tetragonoloba

<220>
25 <221> primer_bind
    <222> Complement((2)..(21))

<220>
<221> primer_bind
30 <222> (385)..(404)

<400> 9
    tgcatcgatg aagaacgcag cgaaatgcga tacttggtgt gaattgcaga atccccgcga 60
    ccttcgagtc tttgaacgca agttgcgccc gaagccatta ggccgagggc acgcctgcct 120
35   gggcgtcgcg cgtcgttgcc ctaactcgga cgtctcattt ggtgtcgttg agtggcgaat 180
    gttggcttcc caccgagcgt gcctcatggt tggttgaaat tcgagtcctg ggtggaggat 240
    gccacgattg atatggtggt tgagtaatta gtcgagacc catcgtgagc gactccatct 300
    tgttttggac tctttgacct acatgagcat ctccgatgct cgttacgaga cctcaggtca 360
    gacgggggta cccgctgagt ttaagcatat caataagcgg aggaa 405
40

<210> 10
<211> 410
<212> ADN
45 <213> Ceratonia siliqua

<220>
<221> primer_bind
<222> (2)..(23)
50

<220>
<221> primer_bind
<222> Complement((385)..(404))

55 <400> 10
    tgcacgagtg aagaacgcag cgaaatgcaa tacttggtgt gaattgcaga atcttctgaa 60
    ccatcaagtc tttgaacaca agttgtgccc gaagccatca agccgaaggc acgtctgcct 120
    ggtgtgcaca cactgtcgcc cccaccccggt ggctctcgcg gtggcttcga ggaatgggca 180
    gattatggcc ttccgtgagc ttgcgcttat ggatggccca aaagagagtt cgcggtggcg 240

```

WO 01/66794

PCT/ES01/00079

4

```
actgccacga cgcacggtgg atgagcaaag actcaagacc agtcgtgcaa gtgtcatacc 300
cgggattgcg ctcgagagacc cttcagcatc gcgaggtgca tatgcctcga acgggaccct 360
aagtcaggcg gggctactcg ctgagtttaa gcatatcaat aagcggagga 410
```

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 01/00079

<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</p> <p>IPC7 C12Q 1/68 C12P 19/34</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>																							
<p>B. FIELDS SEARCHED</p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)</p> <p>IPC7 C12Q</p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)</p> <p>CIBEPAT, WPI, CAPLUS, FROSTI, FSTA, BIOSIS, STRAND</p>																							
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WHITE, T., et al.: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. IN PCR Protocols. A guide to methods and Applications. Academic Press, Inc., San Diego. 1990, pages 315-322 Cited in the application</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>P, X</td> <td>BARKER N.P., et al.: "Generic relationships in the tribe Indigoferae (Leguminosae: Papilionoideae) based on sequence data and morphology"; junio 2000 EMBL/GenBank/DBJ [in line]</td> <td>2, 4-5</td> </tr> <tr> <td>P, Y</td> <td>[Retrieved of 2001-05-06] Retrieved from: EPO STRAND.</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>access n° AF274687</td> <td>7</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>DLAUCHY, DENES et al., Restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA as a taxonomic tool in yeast identification. 1999</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Syst. Appl. Microbiol. 22 (3), 445-453</td> <td>7</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WHITE, T., et al.: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. IN PCR Protocols. A guide to methods and Applications. Academic Press, Inc., San Diego. 1990, pages 315-322 Cited in the application	1	P, X	BARKER N.P., et al.: "Generic relationships in the tribe Indigoferae (Leguminosae: Papilionoideae) based on sequence data and morphology"; junio 2000 EMBL/GenBank/DBJ [in line]	2, 4-5	P, Y	[Retrieved of 2001-05-06] Retrieved from: EPO STRAND.	3	A	access n° AF274687	7	Y	DLAUCHY, DENES et al., Restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA as a taxonomic tool in yeast identification. 1999	3	A	Syst. Appl. Microbiol. 22 (3), 445-453	7
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																					
X	WHITE, T., et al.: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. IN PCR Protocols. A guide to methods and Applications. Academic Press, Inc., San Diego. 1990, pages 315-322 Cited in the application	1																					
P, X	BARKER N.P., et al.: "Generic relationships in the tribe Indigoferae (Leguminosae: Papilionoideae) based on sequence data and morphology"; junio 2000 EMBL/GenBank/DBJ [in line]	2, 4-5																					
P, Y	[Retrieved of 2001-05-06] Retrieved from: EPO STRAND.	3																					
A	access n° AF274687	7																					
Y	DLAUCHY, DENES et al., Restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA as a taxonomic tool in yeast identification. 1999	3																					
A	Syst. Appl. Microbiol. 22 (3), 445-453	7																					
<p><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.</p>																							
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>																							
<p>Date of the actual completion of the international search</p> <p>07 June 2001 (07.06.01)</p>		<p>Date of mailing of the international search report</p> <p>04 July 2001 (04.07.01)</p>																					
<p>Name and mailing address of the ISA/</p> <p>S.P.T.O.</p>		<p>Authorized officer</p>																					
<p>Facsimile No.</p>		<p>Telephone No.</p>																					

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 01/00079

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DAWKINS, N.L. Studies on the extractability, structural and physicochemical properties of oat gum/beta. glucan. 1994 Dissertation International Abstract , B, 55 (4) 1240	6-7
A	PANDEY, RAM NARESH et al., Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides 1996 Plan Mol. Biol. Rep. 14(1), 17-22.	6-7